



PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁵: C12Q 1/68, G01N 33/574 C07K 15/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 92/17608 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 15. Oktober 1992 (15.10.92)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP92/00692 (22) Internationales Anmeldedatum: 27. März 1992 (27.03.92) (30) Prioritätsdaten: P 41 10 405.6 28. März 1991 (28.03.91) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: BIRCHMEIER, Walter [CH/DE]; Graf-Spee-Strasse 15, D-4300 Essen 1 (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FRIXEN, Uwe [DE/DE]; Esmarchstrasse 8, D-4300 Essen 1 (DE). BEHRENS, Jürgen [DE/DE]; Holsterhauserstrasse 59, D-4300 Essen 1 (DE). (74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstraße 9, D-8000 München 80 (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), MC (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US. Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(54) Title: PROCESS FOR DETECTING THE DIFFERENTIATION AND INVASIVENESS OF CARCINOMA CELLS		
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS DER DIFFERENZIERUNG UND DER INVASIVITÄT VON KARZINOMZELLEN		
(57) Abstract <p>A process for detecting the invasiveness and differentiation of tumor cells of epithelial origin in which the expression of the superficial antigen E-cadherin in tumour cells is investigated on the protein plane, especially by monoclonal antibodies, and/or on the mRNA plane, and the use of a monoclonal antibody against E-cadherin or a nucleic acid probe mRNA-complementary to E-cadherin to detect the invasiveness of tumour cells of epithelial origin.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Verfahren zum Nachweis der Invasivität und Differenzierung von Tumorzellen epithelialen Ursprungs, bei dem man die Expression des Oberflächenantigens E-Cadherin in Tumorzellen auf Proteinebene, insbesondere durch monoklonale Antikörper, oder/und auf mRNA-Ebene untersucht, sowie die Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen E-Cadherin oder einer zu E-Cadherin mRNA komplementären Nukleinsäure-Sonde zum Nachweis der Invasivität von Tumorzellen epithelialen Ursprungs.</p> <div style="text-align: right;"> <pre> HC6-1 1 GGAGGTCCTTTAAGGGGCTGTCTGGAAGGCTGCTTCCAGGAACCTCTGTGATGAGGT 68 MENSCH 279 GGAGGTCCTTTAAGGGGCTGTCTGGAAGGCTGCTTCCAGGAACCTCTGTGATGAGGT 338 MAUS 865 GGAGGTCCTTTAAGGGGCTGTCTGGAAGGCTGCTTCCAGGAACCTCTGTGATGAGGT 924 HC6-1 61 CACAGCCACAGAGGCGGACGATGATGTGAACACCTACAACTGCGGCATCGTTACACCAT 128 MENSCH 339 CACAGCCACAGAGGCGGACGATGATGTGAACACCTACAACTGCGGCATCGTTACACCAT 398 MAUS 925 CACAGCCACGATGCGAGGCGGACGATGATGTGAACACCTACAACTGCGGCATCGTTACACCAT 984 HC6-1 121 CCTCAGCCAGAGATCCTGAGCTCCCTGACAAAATATGTTCACTTAACAGGACACAGG 188 MENSCH 399 CCTCAGCCAGAGATCCTGAGCTCCCTGAGAAAATATGTTCACTTAACAGGACACAGG 420 MAUS 985 CCTCAGCCAGAGATCCTGAGCTCCCTGACAAAATATGTTCACTTAACAGGACACAGG 1044 HC6-1 181 AGTCATCAGTGTGCTGCTCAGCTGGGCTGGACCGAGAGAGTTTCTCTACGTATACCTGGT 240 MAUS 1045 AGTCATCAGTGTGCTCAGCTGGGCTGGACCGAGAGAGTTTCTCTACGTATACCTGGT 1104 HC6-1 241 GGTTCAGGCTGCTGACCTTCAAGGTTAGGGGTTAAGGCAACAGGCAACAGCTGTGATCAC 300 MAUS 1105 GGTTCAGGCTGCTGACCTTCAAGGTTAGGGGTTAAGGCAACAGGCAACAGCTGTGATCAC 1164 HC6-1 301 AGTCACTGACACCAAGATAATCTCCGATCTTCAATCCACACGTCACAGGGTCAAGT 368 MAUS 1165 AGTCACTGACACCAAGATAATCTCCGATCTTCAATCCACACGTCACAGGGTCAAGT 1224 HC6-1 361 GCTTGAGAACGAGGCTAAGCTGTAA 386 MAUS 1225 GCTTGAGAACGAGGCTAAGCTGTAA 1251 </pre> </div>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FI	Finnland	MN	Mongolei
AU	Australien	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BB	Barbados	GA	Gabon	MW	Malawi
BE	Belgien	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	PL	Polen
BJ	Benin	HU	Ungarn	RO	Rumänien
BR	Brasilien	IE	Irland	RU	Russische Föderation
CA	Kanada	IT	Italien	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SE	Schweden
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SU	Soviet Union
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TC	Togo
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE*	Deutschland	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		
ES	Spanien	ML	Mali		

Verfahren zum Nachweis der Differenzierung
und der Invasivität von Karzinomzellen
B E S C H R E I B U N G

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis der Differenzierung und Invasivität von Tumorzellen und Tumoren epithelialen Ursprungs.

Die Karzinogenese ist gewöhnlich ein mit vielen Schritten ablaufender Prozeß, der unter anderem die Aktivierung, Mutation oder den Verlust von verschiedenen Genen einschließt. In den betroffenen Zellen bewirken diese Veränderungen den Verlust der Wachstumskontrolle, die Invasion von benachbartem Gewebe, Attraktion von Blutgefäßen (Angiogenese) oder die Metastasenbildung auch in entfernten Organen (siehe hierzu auch Nicholson, Biochim. Biophys. Acta 695 (1982), 113-176; Klein und Klein, Nature 315 (1985), 190-1995). Für einige dieser Tumor-Progressionsschritte ist die Veränderung von zellulären Wechselwirkungen notwendig und daher spielen Zelladhäsionsmoleküle dabei eine wichtige Rolle.

Karzinome können aufgrund von morphologischen Kriterien unterteilt werden. Es gibt differenzierte ("well differentiated") Karzinome, die im wesentlichen die ursprünglichen epithelialen Zellstrukturen beibehalten und z.B. gut entwickelte interzelluläre Verbindungen besitzen. Diese Art von Karzinomen sind meist schwach oder gar nicht invasiv. Im Gegensatz dazu gibt es entdifferenzierte ("poorly differentiated") Karzinome, die eine mehr amorphe Gewebestruktur besitzen und weniger interzelluläre Verbindungen aufweisen. Diese Art von Karzinomen ist oft stärker invasiv (Gabbert et al., Clin. Exp. Metastasis 3 (1985) 257-279). Da nachgewiesen wurde, daß das Ausmaß an Differenzierung und die Stärke der Invasivität verschiedener Karzinome oft die Überlebensprognose von Patienten bestimmt (Morson und Dawson (1979), Gastrointestinal Pathology, 2nd ed., Blackwell), besteht großes Interesse an der Aufklärung der molekularen Charakteristika der einzelnen Karzinomklassen.

In den vergangenen Jahren wurde eine Reihe von spezifischen Zell-Zell- und Zell-Substrat-Adhäsionsmolekülen identifiziert und untersucht. Dabei wurde unter anderem festgestellt, daß das Zell-Zell-Adhäsionsmolekül, welches mit E-Cadherin (Arc-1, Uvomorulin, L-CAM oder cell-CAM 120/80) bezeichnet wird, eng mit der Entstehung von invasiven Karzinomen verbunden ist. E-Cadherin ist ein 120 kd großes Zelloberflächenglykoprotein, von dem in Gegenwart von Ca^{2+} ein lösliches 80 kd großes Trypsin-Fragment abgespalten werden kann, und das als 135 kd Vorläuferprotein synthetisiert wird (siehe z.B. Peyrieras et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983), 6274-6277). Es wurde festgestellt, daß nicht transformierte Epithelzellen dieses Protein auf ihrer Oberfläche tragen, die Blockierung dieses Proteins durch einen monoklonalen Antikörper aber dazu führt, daß die Zellen invasiv werden, und schließlich, daß viele transformierte Epithelzellen dieses Protein nicht auf ihrer Oberfläche tragen (Behrens et al., J. Cell Biol. 108, 2435-2447 (1989)).

Wie man weiß, sind 90 % der malignen menschlichen Tumoren Karzinome, welche aus transformierten Epithelzellen entstehen und das darunterliegende Mesenchym invadieren können. Es wurde weiter festgestellt, daß die Invasivität mit der Bösartigkeit der Tumoren verbunden ist, wogegen gutartige Tumoren nicht invasiv sind. Diese können zwar stark expansiv sein und eine enorme Größe erreichen, jedoch invadieren sie Bindegewebe nicht. Bösartige Tumoren sind dagegen oftmals klein, jedoch invadieren sie die mesenchymalen Strukturen leicht und bilden dadurch schnell Metastasen im ganzen Körper.

Es sind bereits einige Verfahren bekannt, welche die Klassifizierung von bestimmten Karzinomen erlauben. So kann durch Untersuchung von Keratinen und intermediären Filamentproteinen eine Unterscheidung von Tumoren aus verschiedenen Geweben erfolgen (Osborn und Weber, Lab. Invest. 48 (1983), 372-394).

Weiterhin können desmosomale Proteine als Marker zur Identifizierung und Klassifizierung gewisser epithelialer Tumore dienen (Moll et al., Lab. Invest. 54 (1986), 4-25). Weiterhin kann für Karzinome des Verdauungstrakts das karzino-embryonische Antigen (CEA) als wertvoller Indikator dienen (Mentges, Dtsch. Med. Wschr. 112 (1987), 1245-1249). Der Östrogenrezeptor ist ebenfalls ein nützlicher Marker für das Differenzierungsstadium von Brustkarzinomen (Engel und Young, Cancer Res. 38 (1978), 4327-4339). Schließlich können auch Onkogene, z.B. das Ki-ras-Gen (Almoguera et al., Cell 53 (1988), 549-554) und Tumorsuppressorgene, z.B. das Retinoblastom-Suszeptibilitäts-gen (Bookstein et al. (1990), Science 247, 712-715), das Wilms-Tumorgen (Haber et al. (1990), Cell 61, 1257-1269) oder das p53-Gen (Tsai et al. (1990), Cancer Res. 50, 44-47) als Indikatoren für bestimmte Karzinome dienen. Das Charakteristische aller dieser Verfahren ist jedoch, daß die dabei verwendeten Indikatoren jeweils nur bei ganz bestimmten Tumorarten verwendet werden können.

Es ist daher die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein einfaches Verfahren zu entwickeln, welches eine generellere Bestimmung der Invasivität von epithelialen Tumorzellen erlaubt und es dadurch ermöglicht, eine schnelle und zuverlässige Unterscheidung zwischen gutartigen und bösartigen Tumorgewebe zu treffen.

Gelöst wird die erfindungsgemäße Aufgabe durch ein Verfahren zum Nachweis der Differenzierung oder/und Invasivität von Tumorzellen und Tumoren epithelialen Ursprungs, bei dem man die Expression des Oberflächenantigens E-Cadherin in Tumorzellen auf Proteinebene oder/und auf mRNA-Ebene untersucht. Dabei wurde gefunden, daß die Expression von E-Cadherin bei allen bisher untersuchten Tumorzelllinien und Tumoren epithelialen Ursprungs proportional mit zunehmender Entdifferenzierung und Invasivität abnimmt.

Die verschiedenen getesteten differenzierten und entdifferenzierten menschlichen Karzinoma-Zelllinien epithelialen Ursprungs sind von der Tumorbank des Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg (DKFZ) und der American Type Culture Collection (ATCC) erhältlich. Es wurden folgende Zelllinien verwendet: RT4 und RT112 (von differenzierten Blasen-Karzinomen), EJ28 (von einem entdifferenzierten Blasen-Karzinom), CX-1 WiDr, HCT116, SW948 und C0L0205 (von differenzierten Colon-Karzinomen), SW620 (von einem entdifferenzierten Colon-Karzinom), MCF-7 und MDA-MB-361 (von einem differenzierten Brust-Karzinom), BT-549 (von einem Brustkarzinom mit intermediärem Phänotyp), MDA-MB-231, -435S und -436 (von entdifferenzierten Brust-Karzinomen), LX-1 (von einem differenzierten Lungen-Karzinom), A-427 und A-549 (von Lungen-Karzinomen mit intermediärem Phenotyp), LXF 289 und SK-MES-1 (von entdifferenzierten Lungen-Karzinomen), Capan-1, Capan-2 und DAN-G (von differenzierten Pankreas-Karzinomen), Hs 766T (von einem Pankreas-Karzinom mit intermediärem Phenotyp) und MIA PaCa-2 (von einem entdifferenzierten Pankreaskarzinom). Detailliertere Hinweise auf diese Zelllinien finden sich in Tabelle 1.

Bei Experimenten mit diesen Zellen wurde gefunden, daß bei allen untersuchten Tumor-Zelllinien die E-Cadherin-Expression mit dem Differenzierungsstadium bzw. der Invasivität der jeweiligen Zelllinie korreliert. Es ist daher anzunehmen, daß diese Korrelation nicht auf die oben erwähnten Zelllinien beschränkt ist, sondern generell bei Tumorzelllinien epithelialen Ursprungs gefunden wird.

Weiterhin wurden auch Untersuchungen an verschiedenen menschlichen Tumoren auf die Expression von E-Cadherin durchgeführt. Bei Larynx- und Pharynx-Plattenepithelkarzinomen, bei lobulären Brustkarzinomen sowie bei Ovarialkarzinomen wurde festgestellt, daß Normalgewebe und differenzierte Tumore E-Cadherin exprimieren, während weniger differenzierte ("moderately well differentiated") und dedifferenzierte Tumore wenig oder kein E-Cadherin exprimieren.

Zum Nachweis von E-Cadherin in Tumorzellen und Tumoren können prinzipiell zwei Verfahren verwendet werden. Die Expression von E-Cadherin kann auf Proteinebene oder/und auf mRNA-Ebene untersucht werden.

Ein Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen E-Cadherin zum Nachweis der Differenzierung und Invasivität von Tumorzellen, wobei man die Tumorzelloberfläche oder Gewebeschnitte auf Anwesenheit von E-Cadherin durch Bindung eines der erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper in markierter Form untersucht. Hierbei kann davon ausgegangen werden, daß Zellen oder Gewebe, welche E-Cadherin an ihrer Oberfläche tragen, weniger invasiv sind und daher die Gefahr der Invasion und Metastasierung der Zellen geringer ist. Weisen die Zelloberflächen oder Gewebeschnitte jedoch kein E-Cadherin auf, an das die monoklonalen Antikörper binden, muß davon ausgegangen werden, daß es sich um eher bösartige, nämlich invasive Tumorzellen handelt.

Für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens zum Nachweis der Invasivität oder/und Differenzierung von Tumorzellen mit Hilfe von markierten monoklonalen Antikörpern sind alle an sich bekannten Arten der Markierung des Antikörpers, sowie des Nachweises der Markierung und alle für die Untersuchung mit einem monoklonalen Antikörper gebräuchlichen Testanordnungen geeignet. Zur Markierung der erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper werden vorzugsweise Fluoreszenzmarkierungen eingesetzt, wodurch eine einfache Detektion ermöglicht wird. Weiter kann jedoch auch beispielsweise eine Immuno-Gold-Färbung durchgeführt werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden Extrakte von Tumorzellen (d.h. Gesamtextrakte oder proteolytisch behandelte Extrakte) auf die Anwesenheit von E-Cadherin oder eines Fragments davon durch Bindung von Antikörpern gegen E-Cadherin untersucht. Beson-

ders bevorzugt für dieses Verfahren ist die Verwendung des monoklonalen Antikörpers 6F9 zum Nachweis von E-Cadherin oder eines Fragments davon.

Die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper erkennen und binden spezifisch an das Zell-Adhäsionsmolekül E-Cadherin. Der bevorzugte Antikörper 6F9 wird von den bei der GBF Braunschweig hinterlegten Hybridomazelllinie 6F9 (Hinterlegungsnummer ACC 1006) sekretiert.

Zum Nachweis von E-Cadherin sind jedoch neben den genannten Antikörpern ebenso auch andere monoklonale Antikörper (z.B. 15G7 und 15C12) gegen dieses Protein geeignet. Die Herstellung solcher Antikörper kann auf übliche Weise durch Immunisierung von Versuchstieren mit E-Cadherin oder einem Fragment davon und anschließender Gewinnung der resultierenden Antikörper erfolgen.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren zum Nachweis von E-Cadherin mit monoklonalen Antikörpern wird es ermöglicht, mittels einfacher Untersuchung festzustellen, ob ein eher gutartiger oder bösartiger Tumor vorliegt, d.h. um das Risiko der Invasivität und Metastasierung einzuschätzen.

Weiterhin ist es auch möglich, die Expression von E-Cadherin auf mRNA-Ebene nachzuweisen. Der Nachweis von mRNA erfolgt dabei auf an sich bekannte Weise durch Hybridisierung mit einer Nukleinsäure-Sonde. Die Nukleinsäure-Sonde kann z.B. ein cDNA-Fragment oder ein synthetisches Oligonukleotid sein. Sie muß jedoch zur E-Cadherin mRNA komplementär sein und eine ausreichende Länge besitzen, so daß ein eindeutiger Nachweis von E-Cadherin mRNA erfolgen kann. Die Nukleinsäure-Sonde kann dabei die gesamte für E-Cadherin kodierende cDNA oder einen Teil daraus umfassen. Vorzugsweise enthält die Nukleinsäure-Sonde ein mindestens 14 Basen langes, zu E-Cadherin mRNA komplementäres Fragment. Vorzugsweise kann die in Fig. 1

dargestellte DNA-Sequenz des Klons HC6-1 oder eine mindestens 14 Nukleotide lange Teilsequenz dieser DNA-Sequenz verwendet werden. Die für das erfindungsgemäße Verfahren verwendete Nukleinsäure-Sonde sollte markiert sein, d.h. sie enthält radioaktive oder auf andere Weise markierte (z.B. biotinylierte) Nukleinsäurereste. Die Markierung selbst kann auf eine dem Fachmann bekannte Weise am Ende oder/und innerhalb der Nukleinsäure-Sonde angebracht werden (z.B. durch Kinasierung, Nicktranslation, Random-Priming etc.).

Zum Nachweis von E-Cadherin mRNA wird die RNA aus Tumorzellen isoliert. Dies kann auf an sich bekannte Weise geschehen, vorzugsweise jedoch durch Lysis der Zellen mit einem nicht-ionischen Detergens in Gegenwart von RNasin und anschließender heißer Extraktion mit Phenol. Gegebenenfalls kann anschließend eine Anreicherung der poly-A⁺-RNA erfolgen. Das Vorhandensein von E-Cadherin mRNA wird durch Northern Blot Hybridisierung mit der oben beschriebenen Nukleinsäure-Sonde durchgeführt. Dabei kann die RNA vor der Hybridisierung elektrophoretisch aufgetrennt werden und anschließend auf eine Membran transferiert werden, so daß eine eindeutige Identifizierung anhand ihrer Länge möglich ist. Alternativ kann die Methode der RNAase-Protektion angewandt werden. Ist eine elektrophoretische Auftrennung nicht erforderlich, so kann die E-Cadherin mRNA-Expression auch durch Dot-Blot-Hybridisierung nachgewiesen werden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, Gewebeschnitte mit der Methode der "in situ"-Hybridisierung auf E-Cadherin-Transkripte zu untersuchen.

Die folgenden Beispiele erläutern in Verbindung mit den Figuren 1 und 2 die Erfindung weiter.

Fig. 1 zeigt die Nukleotidsequenz des E-Cadherin cDNA-Klons HC6-1.

Fig. 2 zeigt die Invasivität von Tumorzelllinien in Korrelation zur E-Cadherin-Expression.

Beispiel 1

Herstellung von Antikörpern gegen E-Cadherin

1.1 Reinigung des 80 kd Trypsin-Fragments von menschlichem E-Cadherin

Zur Herstellung des 80 kd Trypsin-Fragments von menschlichem E-Cadherin wurden A-431 Zellen (ATCC CRL 1555, menschliche Vulva-Karzinomzellen) mit einem Gummischaber von der Kulturschale abgelöst. Die Kultivierung von A-431 Zellen erfolgte wie in Beispiel 2.1 beschrieben. Das Zellgewebe wurde homogenisiert, abzentrifugiert, resuspendiert und mit Trypsin in Gegenwart von Ca^{2+} behandelt (Behrens et al., J. Cell. Biol. 108 (1989), 2435-2447). Das solubilisierete Material wurde auf einer Affinitätssäule chromatographiert, die durch Kopplung von 40 mg der IgG-Fraktion von Kaninchen-Anti Hund-Arc-1/Uvomorulin-Antiserum an 5 ml CNBr-Sepharose hergestellt wurde. Das 80 kd Trypsin-Fragment wurde spezifisch mit 5 mmol/l EDTA, 500 mmol/l NaCl, 50 mmol/l Tris-HCl, pH 8,5 eluiert und durch Acetonfällung bei -70°C konzentriert. Aus 1 g Naßzellen konnten gewöhnlich 1,5 μg des 80 kd Trypsin-Fragments von menschlichen E-Cadherin isoliert werden.

1.2 Herstellung monoklonaler Antikörper

Zur Herstellung monoklonaler Antikörper wurden BALB/c-Mäuse mit dem Antigen (3 μg pro Tier und Immunisierung) immunisiert unter Verwendung des ABM-Adjuvans-Systems (Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA). Milzzellen von immunisierten Mäusen wurden auf bekannte Weise mit P3-X63-Ag 8.653 Maus-Myelomzellen fusioniert (Kearney et al., J. Immunol. 123 (1983), 1548-1550). Die resultierenden Hybridom-Zelllinien wurden auf Gewebekulturplatten kultiviert.

Die Hybridom-Überstände wurden in einem Enzym-gekoppelten Immuntest unter Verwendung von Mikrotiterplatten mit 96 Löchern (NUNC, Dänemark) untersucht, die mit 75 ng pro Loch des Trypsin-Fragments von menschlichem E-Cadherin beschichtet waren. Antikörper mit Bindungs-Affinität an das Festphasen-Antigen wurden unter Verwendung von Peroxidase-gekoppelten Ziegen-Anti-Maus-Antikörpern gefunden, die spezifisch für IgG waren (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA). Positive Hybridom-Überstände wurden durch Immunfluoreszenz auf menschlichen A-431-Karzinomzellen, Gefrierschnitten von menschlichem Dünndarm und durch Western-Blot-Analyse von A-431 Zellextrakten getestet. Zur Immunfluoreszenz von A-431-Zellen wurden die Kulturen mit 4 % Formaldehyd in PBS fixiert, mit 0,1 % Triton X-100 permeabilisiert und mit den Hybridom-Überständen und einem geeigneten zweiten, Fluorescein- oder Rhodamin-gekoppelten Antikörper inkubiert (Behrens et al., (1989), supra). Zur Immunfluoreszenz von Gefrierschnitten von menschlichem Dünndarm (8 μ m) wurde das Gewebe mit Ethanol bei -20°C fixiert und wie beschrieben mit den Antikörpern inkubiert (Behrens et al., (1989), supra). Mit Western Blots wurden die verschiedenen Hybridom-Überstände auf Reaktion sowohl mit dem 80 kd Trypsin-Fragment von E-Cadherin und mit der 120 kd reifen Form des Moleküls getestet. Zur Sichtbarmachung der 120 kd Bande wurden frisch abgeschabte A-431-Zellen 5 Minuten lang bei 96°C mit 2 % SDS, 5 % 2-Mercaptoethanol in L-CAM-Testpuffer (Cunningham et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984), 5787-5791) lysiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 100.000 g (2 Stunden bei 12°C), SDS-Gelelektrophorese und Western Blot Analyse (siehe Behrens et al., Supra). Die Protein-A-Bindung der Antikörper wurde durch Adsorption der Hybridom-Überstände an fixierte Staphylococcus aureus Zellen in Gegenwart von 1 % Triton X-100 getestet, gefolgt von einer Analyse der

SDS-Extrakte durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen. Die Antikörper-Isotypen wurden unter Verwendung eines Maus-monoklonalen Isotyp-Kits (Serotec, Oxford, England) bestimmt.

Von 1200 getesteten Hybridom-Überständen enthielten etwa 30 IgG-Antikörper, die mit dem 80 kd-Fragment von E-Cadherin in einem Enzym-gekoppelten Immuntest reagierten. Davon waren 13 auch bei der Immunfluoreszenz, sowohl bei A-431 menschlichen Karzinomzellen (d.h., daß die Zell-Zell-Kontaktstellen gefärbt wurden) als auch an Gefrierschnitten des menschlichen Dünndarms (d.h., daß die lateralen Ränder der Epithelzellen gefärbt wurden) positiv. Diese Antikörper zeigten eine Immunreaktion mit dem 120 kd reifen E-Cadherin-Protein und mit dem 80 kd Trypsin-Fragment auf Western Blots. Weiterhin zeigten sie Bindung an Protein A. Die weiteren Experimente wurden mit 3 dieser Antikörper 6F9, 15C12 und 15G7 durchgeführt, die von den entsprechenden Hybridom-Zelllinien sekretiert werden und hochspezifisch mit den 120 und 80 kd E-Cadherin-Banden bei Western Blots reagieren. Der Antikörper 6F9 ist von Bissendorf Chemikalien, Hannover und Eurodiagnostics kommerziell erhältlich. Die entsprechende Hybridomzelllinie ist bei der GBF Braunschweig unter der Nummer ACC 1006 hinterlegt. Alle drei monoklonalen Antikörper 6F9, 15C12 und 15G7 waren in der Lage, spezifisch das Epithel von menschlichem Dünndarm anzufärben. Die Färbung war auf die lateralen Ränder der epithelialen Zellen beschränkt und eine Intensivierung der Färbung war im Bereich des Verbindungskomplexes zu sehen.

B e i s p i e l 2

Immunologischer Nachweis der E-Cadherin-Expression in verschiedenen menschlichen Tumor-Zelllinien.

2.1 Zelllinien

Die verschiedenen getesteten, differenzierten und entdifferenzierten menschlichen Karzinom-Zelllinien sind entweder bei der Tumorbank des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) oder bei der American Type Culture Collection (ATCC) erhältlich. Die Literatur stellen, in denen die verschiedenen getesteten Zelllinien beschrieben werden, sind aus Tabelle 1 ersichtlich. Die Zelllinien wurden in DMEM mit 10 % foetalem Kalbserum unter Standard-Zellkultur-Bedingungen kultiviert.

2.2 Immunologische Analyse der E-Cadherin-Expression

Zur Immunfluoreszenz von E-Cadherin in Gewebekulturzellen wurden mit 100.000 g zentrifugierte Hybridomüberstände oder Protein A gereinigte Antikörper (mit 50 mmol/l Ethanolamin, pH 11 von Protein-A-Sepharose eluiert) verwendet. Die Immunfluoreszenz der Cytokeratine wurde nach Sun und Green, Cell 14, 469-476 1978) unter Verwendung von Breitspektrum-Antikörper (Jackson Immunoresearch Laboratories und Cammon Laborservice, Wiesbaden) durchgeführt. Für Western Blot Experimente wurden 50 µg des Gesamt-Zellproteins auf eine Gelspur geladen und die Nitrozellulose-Blots wurden mit den entsprechenden Hybridom-Überständen und einem geeigneten zweiten Antikörper inkubiert. Die quantitative Antikörper-Bindung an fixierte Gewebekultur-Zellen wurde im wesentlichen wie bei Behrens et al. (1989) supra beschrieben durchgeführt, abgesehen davon, daß ein Radiojodierter zweiter Antikörper verwendet wurde. Menschli-

che Karzinomzellen wurden über Nacht in flexiblen Mikrotiterplatten mit 96 Löchern (5×10^4 Zellen pro Loch) kultiviert, mit Formaldehyd fixiert und mit Triton X-100 permeabilisiert. Nach Inkubation mit den entsprechenden Hybridom-Überständen (diese waren eine Stunde lang bei Raumtemperatur über fixierten MRC-5 menschlichen Lungenfibroblasten präabsorbiert) wurden die Zellen gewaschen und mit einem Ziegen-Anti-Maus-IgG (Jackson), markiert mit ^{125}I , unter Verwendung der Lactoperoxidase-Methode (2×10^7 Ipm/ μg , 5×10^5 Ipm pro Loch) inkubiert. Die Löcher wurden dann ausgeschnitten und die Radioaktivität aus dreifach durchgeführten Experimenten in einem γ -Zähler bestimmt.

Es wurde gefunden, daß die Zellen aus differenzierten Tumoren im allgemeinen eine epitheloide Morphologie in Gewebekultur aufwiesen, während die aus entdifferenzierten Tumoren erhaltenen Zellen eine fibroblastoide Gestalt aufwiesen (siehe Tabelle 1).

Durch Immunofluoreszenz von Cytokeratinen unter Verwendung eines Breitspektrum-Antiserums wurde bestätigt, daß alle untersuchten Tumor-Zelllinien epithelialen Ursprungs waren.

Durch immunologische Untersuchung mit den monoklonalen Antikörpern 6F9, 15G7 und 15C12 wurde gefunden, daß die differenzierten Karzinom-Zelllinien im allgemeinen E-Cadherin exprimierten, während die entdifferenzierten Karzinom-Linien negativ für dieses Zell-Adhäsions-Molekül waren. Zum Beispiel wurde bei einem Immunfluoreszenz-Test mit dem Antikörper 6F9 wurde festgestellt, daß die differenzierte Blasen-Karzinom-Zelllinie RT4 in Gebieten mit Zell-Zell-Kontakt E-Cadherin stark exprimierte, während die entdifferenzierte Blasen-Karzinom-Zelllinie EJ28 keine Fluoreszenz und demnach auch keine

Expression von E-Cadherin zeigte. Ebenso exprimierten die differenzierten Brust- (MCF-7 und MDA-MB-361), Lungen- (LX-1) und Pankreas- (DAN-G) Karzinom-Zelllinien E-Cadherin, während die entsprechenden entdifferenzierten Brust- (MDA-MB-435S, MDA-MB-436 und MDA-MB-231), Lungen- (LXF289) und Pankreas- (MIA-PaCa2) Karzinom-Zelllinien negativ waren. 4 differenzierte Colon-Karzinom-Zelllinien (CX-1, WiDr COLO205 und HTC 116) waren ebenso im Immunfluoreszenz-Test positiv, während die entdifferenzierte Colon-Karzinom-Zelllinien SW620 hauptsächlich aus sphärischen Zellen ohne E-Cadherin-Expression und einer epitheloiden E-Cadherin-positiven Subpopulation bestand. Bei den intermediären Lungenkarzinom-Zelllinien A-427 und A-549 exprimierten nur epitheloide Subpopulationen E-Cadherin.

Die relativen Färbintensitäten von E-Cadherin bei der Immunfluoreszenz korrespondieren mit der beim Western-blot gefundenen Menge des Moleküls. Zum Beispiel waren Extrakte der differenzierten Blasen- und Brust-Karzinom-Zelllinien RT112, RT4 und MCF-7 positiv für das reife 120 kd Polypeptid, während die entdifferenzierten Blasen (EJ28) und die drei Brust MDA-MB-Karzinom-Zelllinien negativ waren. Diese Unterschiede bei der Expression von E-Cadherin zwischen den epitheloiden und fibroplastoiden Karzinom-Zelllinien wurden ebenso bei anderen getesteten Antikörpern, z.B. 15C12 und 15G7 gefunden.

T a b e l l e 1

Charakterisierung der menschlichen Zelllinien

Zelllinie	Differenzierungscharakteristik	Morphologie der kultivierten Zellen ^{a)}	E-Cadherin- Expres- sion ^{b)}
<u>Blase</u>			
RT4	aus einem differenzierten Karzinom (DKFZ, Rigby und Franks (1970), B.J.Cancer 24, 746-754)	E	+
RT112	aus einem differenzierten Karzinom (DKFZ, Steele et al. (1983), Biochim.Biophys.Acta 732, 219-228)	E	+
EJ28	aus einem anaplastischen Karzinom (DKFZ, Hstings und Franks (1983), Br.J.Cancer 47, 233-244)	F	-
<u>Kolon</u>			
CX-1	differenzierte, CEA-positive Zelllinie ^{c)} (DKFZ, Daneker et al. (1989), Cancer Res. 49, 681-686)	E	+
WiDr	aus einem Adenokarzinom (ATCC, Noguchi et al. (1979), In Vitro (Rockville) 15, 401-408)	E	+
HCT116	CEA-positive Zelllinie ^{c)} (ATCC; eigener Befund, vgl. mit Boyd et al. (1988), Cancer Res. 48, 3112-3116)	E	+

T a b e l l e 1
(Fortsetzung)

Zelllinie	Differenzierungscharakteristik	Morphologie der kulti- E-Cadherin- vierten Expres- Zellen a) sion b)	
SW620	entdifferenzierte, CEA-negative Zelllinie ^{c)} (ATCC, Leibowitz et al. (1976), Cancer Res. 36, 4562-4569)	Sph und E ^{d)}	-/+ ^{d)}
SW948	aus einem undifferenzierten Adenokarzinom in Kultur differenziert (ATCC, Leibowitz et al (1976), supra)	E	+
COLO205	aus einem anaplastischen Adenokarzinom, in Kultur differenziert (ATCC, Semple et al. (1978), Cancer Res. 38, 1345-1355)	Sph und E ^{d)}	+
<u>Pankreas</u>			
Capan-1	differenzierte Adenokarzinomzellen (DKFZ, Fogh et al. (1977), J.Natl.Cancer Inst. 58, 209-214)	E	+
Capan-2	Adenokarzinomzelllinie (DKFZ, Fogh et al. (1977), supra)	E	+
DAN-G	aus einem differenzierten Karzinom (DKFZ, H. Löhrke, Heidelberg, pers. Mitt.)	E	+

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Zelllinie	Differenzierungscharakteristik	Morphologie der kultivierten Zellen ^{a)}	E-Cadherin- Expres- sion ^{b)}
Hs 766 T	aus einer Lymphknoten-Metastase (DKFZ, Owens et al., (1976), J.Natl.Cancer Inst. 56, 843-849)	F/E ^{f)}	-
MIA PaCa-2	aus einem nicht differenzierten Karzinom (ATCC, Yunis et al. (1977), Inst.J.Cancer 19, 128-135)	F	-
<u>Brust</u>			
M CF-7	Eigenschaften von differenziertem Brustepithel, Östrogenrezeptor-positiv ^{e)} (DKFZ, Soule et al. (1973), J.Natl.Cancer Inst. 51, 1409-1416; Engel und Young (1978), Cancer Res. 38, 4327-4339)	E	+
MDA-MB-361	Östrogenrezeptor-positive Zelllinie ^{e)} (DKFZ, Engel und Young (1978), supra)	E	+
BT-549	aus einem invasiven Duktuskarzinom (ATCC)	F/E ^{f)}	+/-
MDA-MB-231	aus einem schwach differenzierten Karzinom, in Kultur spindelförmig, Östrogenrezeptor-negativ ^{e)} (DKFZ, Cailleau et al. (1974), J.Natl.Cancer Inst. 53, 661-674; Engel und Young (1978), supra)	F	-
MDA-MB-435 S	spindelförmige Zelllinie (DKFZ, Callea et al. (1978), In Vitro (Rockville) 14, 911-915)	F	-

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Zelllinie	Differenzierungscharakteristik	Morphologie der kultivierten Zellen ^{a)}	E-Cadherin- Expres- sion ^{b)}
<u>Lunge</u>	MDA-MB-436 spindelförmige Zelllinie (DKFZ, Caillea et al. (1978) supra)	F	-
	LX-1 aus einem menschlichen Tumor, der nach Passage in Nackt- mäusen als relativ differenziertes Adenokarzinom charak- terisiert wurde (DKFZ, H. Löhre, Heidelberg, pers. Mitt.)	E	+
	A-427 Epithel-artige Zelllinie, viele Zellen mit bizarren Formen (DKFZ, Giard et al. (1973), J.Natl.Cancer Inst. 51, 1417-1423)	E/F ^f)	+/-
	A-549 einige Charakteristika von Typ II alveolaren pithelzellen; Vimentin-positiv (DKFZ, Lieber et al. (1976), Int.J. Cancer 17, 62-70; Blobel et al. (1984), Virchows Arch.B. Cell Pathol. 45, 407-429)	E/F ^f)	-/+
	LXF289 aus einem relativ differenzierten Adenokarzinom, in Kul- tur eine entdifferenzierte Morphologie (DKFZ, H. Löhre, Heidelberg, pers. Mitt.)	F	-
	SK-MES-1 Epithel-artige Zelllinie aus einem schuppigen Karzinom, Vimentin-positiv (DKFZ, Fogh und Trempe (1975), in: Human tumor cell lines in vitro, herausgegeben von J. Fogh und G. Trempe, Plenum Publishing Corp., New York, 115-159; Blobel et al. (1984), supra)	F	-

Tabelle 1
(Fortsetzung)

- a) Die Zellen wurden nach ihrer Morphologie in Zellkultur als epitheloid (E) oder fibroblastoid (F) eingeordnet.
- b) Die E-Cadherin-Expression wurde durch indirekte Immunfluoreszenz bestimmt.
- c) Das karzinoembryonische Antigen (CEA) ist als Marker für differenzierte Colon-Karzinom-Zellen in vitro beschrieben (Daneker et al., Cancer Res. 49 (1989), 681-686).
- d) Sph, die Mehrzahl der Zellen zeigte eine sphärische Morphologie und wird nicht durch Immunfluoreszenz angefärbt, epitheloide Zellen (E) waren E-Cadherin-positiv.
- e) Der Östrogenrezeptor ist ein weit verbreiteter Marker für differenzierte Brust-Karzinome (Engel und Young, Cancer Res. 38 (1978), 4327-4339).
- f) Zelllinien mit intermediärer Morphologie, wobei der erste Buchstabe auf die dominante Form hinweist. Die mehr epitheloiden Formen exprimierten E-Cadherin, die mehr fibroblastoiden Formen waren Immunfluoreszenz-negativ. Hs 766T war generell negativ.

B e i s p i e l 3

Nachweis von E-Cadherin auf mRNA-Ebene

3.1 Herstellung einer Nukleinsäure-Sonde

Um eine geeignete cDNA-Probe zur Analyse des E-Cadherin-Gens und seiner Expression in den verschiedenen Karzinom-Zelllinien zu erhalten, wurde eine menschliche Leber-cDNA-Bank (im kommerziell erhältlichen Plasmid-Expressions-Vektor pUEX1) untersucht. Aus $1,6 \times 10^5$ Klonen wurde der positive Klon HC6-1 isoliert und die Insertion in M13-Phagen subkloniert und mittels der Dideoxymethode unter Verwendung von T7-DNA-Polymerase (Pharmacia) in beiden Richtungen sequenziert. Die DNA-Sequenz der Insertion von HC6-1 ist in Fig. 1 dargestellt. Der partielle cDNA-Klon HC6-1 überlappt mit 142 bp einer anderen partiellen menschlichen cDNA (Mansouri et al., Differentiation 38 (1988), 67-71) und ist zur Maus cDNA homolog (Nagafuci et al., Nature 329 (1987), 341-343).

3.2 Isolierung von RNA aus Zellkulturen

Kultivierte Zellen wurden mit PBS gewaschen, von den Platten mit einem Gummischaber entfernt und auf Eis in 1 % Nonidet P40, 140 mmol/l NaCl, 1,5 mmol/l $MgCl_2$, 100 Einheiten RNasin/ml, 10 mmol/l Tris-Cl, pH 8,0 lysiert. Nach Zentrifugation bei 12.000 Upm wurde der Überstand bei 65°C mit ungepuffertem Phenol mit 1 % SDS, 10 mmol/l EDTA extrahiert. Anschließend folgte eine Extraktion bei Raumtemperatur mit Tris-gepuffertem Phenol, Phenol/Chloroform, Chloroform. Dann erfolgte eine Präzipitierung der Nukleinsäuren bei -20°C mit Ethanol. Poly-A⁺-RNA wurde durch Affinitäts-Chromatographie der Gesamt-RNA an Oligo-dT-Zellulose unter Verwendung der Spun-Column-Methode (Pharmacia) erhalten. Die RNA wurde auf Glyoxal-

gelen elektrophoretisiert (Maniatis et al., Molecular Cloning (1982), Cold Spring Harbor Press, New York, USA). Dann erfolgte ein Blotting auf eine Hybond-N-Membran (Amersham). Die Hybridisierung der Blots mit der Nick-translatierten Nukleinsäure-Sonde wurde über Nacht bei 64°C in 5xSSC, 5x Denhardt's-Lösung, 10 % Dextran-sulfat (Pharmacia), 0,5 % SDS, 100 µg/ml erhitzte Lachsperma-DNA durchgeführt. Die Filter wurden bei Raumtemperatur mit 2xSSC (zweimal 10 Minuten) und anschließend mit 0,5xSSC, 0,1 % SDS bei 64°C (zweimal 15 Minuten) gewaschen, anschließend erfolgte eine Autoradiographie bei -70°C.

Bei Untersuchung der in Tabelle 1 dargestellten menschlichen Karzinom-Zelllinien durch Northern Blot Analyse von Poly-A⁺-RNA unter Verwendung der HC6-1 cDNA-Probe wurden für die einzelnen Zelllinien Unterschiede in der E-Cadherin-Expression gefunden, die denen der immunologischen Experimente entsprachen. Zum Beispiel exprimierten die differenzierten Karzinom-Zelllinien RT112, RT4 (Blase), MCF-7 (Brust), LX-1 (Lunge), Capan-2, DAN-G (Pankreas), CX-1 und HCT116 (Colon) E-Cadherin-mRNA in hohem Ausmaß, während die korrespondierenden entdifferenzierten Karzinom-Zelllinien EJ28 (Blase), die drei MDA-MB-Linien (Brust), SK-MES-1 und LXF289 (Lunge) keinerlei mRNA zeigten. Die Zelllinien mit intermediären Phänotypen, z.B. A-427 (Lunge) und Hs 766T (Pankreas) exprimierten geringe Mengen an mRNA.

Beispiel 4

Test auf Invasivität von Tumor-Zelllinien

4.1 Herstellung von Collagengelen

Typ I Collagen (5 mg/ml, mit 1%iger Essigsäure aus Kalbshaut extrahiert, (Mauch et al., Exp. Cell Res. 163 (1986), 294-300) wurde gegen 0,05%ige Essigsäure dialysiert. 1/10 Volumen von 10fach konzentriertem DMEM (mit 22 mg/ml Natriumbicarbonat) wurde anschließend zugegeben. Dann wurde die Lösung neutralisiert. Aliquots von 1,2 ml pro Loch wurden zur Gelbildung in Sechslöch-Kulturschalen (Nunc) bei 37°C gegeben.

4.2 Test auf Invasivität

Zur Durchführung der Tests auf Invasivität wurden 4×10^5 Zellen (in 1,5 ml DMEM und 10 % foetalem Kalbserum) pro Loch auf die Collagenoberflächen ausplattiert. Nach dreitägiger Kultivierung auf den Collagengelen erfolgte eine Quantifizierung der invasiven Zellen im Lichtmikroskop (Behrens et al., (1989), supra). Die Expression von E-Cadherin wurde in einem indirekten Zellbindungstest unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers 6F9 und 125 I markiertem Ziegen-Anti-Maus-IgG als zweitem Antikörper bestimmt.

Beim Test der menschlichen Karzinom-Zelllinien auf Invasivität in vitro wurde gefunden, daß die Zelllinien mit E-Cadherin-Expression im allgemeinen nicht in Collagen-Gele eindringen, während die E-Cadherin negativen Zelllinien invasiv waren (Abb. 2). Dies ist besonders deutlich bei den Blasen- und Brust-Karzinom-Zelllinien. Bei den Brust- und Lungen-Karzinom-Zelllinien ist eine stufenweise Veränderung vom E-Cadherin-exprimierenden nicht invasiven Zustand zum nicht-exprimieren-

den invasiven Zustand klar erkennbar. Die differenzierten Colon- und Pankreas-Karzinom-Zelllinien waren ebenfalls nicht invasiv. Die intermediäre Pankreas-Karzinom-Zelllinie Hs 766T zeigte nur eine geringe Invasivität.

Eine entdifferenzierte Karzinom-Zelllinie (LXF289) ist in Abb. 2 nicht aufgeführt, da sie sich schlecht an die Mikrotiter-schalen anlagerte und daher die Bindung nicht quantifiziert werden konnte. Diese Zelllinie war in allen anderen Tests eindeutig E-Cadherin-negativ und invadierte das Collagen-Gel (322 Zellen pro cm^2). Die entdifferenzierte menschliche Vulva-Karzinom-Zelllinie A431, die zur Gewinnung von E-Cadherin verwendet wurde, war im Gelinvasionstest negativ.

P A T E N T A N S P R Ü C H E

1. Verfahren zum Nachweis der Differenzierung oder/und Invasivität von Tumorzellen und Tumoren epithelialen Ursprungs, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß man die Expression des Oberflächenantigens E-Cadherin (L-CAM, Arc-1, Uvomorulin, cell-CAM 120/80) in Tumorzellen und Tumoren auf Proteinebene oder/und auf mRNA-Ebene untersucht.
2. Verfahren nach Anspruch 1, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß man Gewebeschnitte oder/und Extrakte von Tumorzellen und Tumoren auf Anwesenheit von E-Cadherin oder eines Fragments davon durch Bindung eines monoklonalen Antikörpers gegen E-Cadherin untersucht.
3. Verfahren nach Anspruch 2, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß man den monoklonalen Antikörper, der von der Hybridom-Zelllinie 6F9 sezerniert wird, zum Nachweis von E-Cadherin oder eines Fragments davon verwendet.
4. Verfahren nach Anspruch 1, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß man Gewebeschnitte oder/und Extrakte von Tumorzellen und Tumoren auf Anwesenheit von E-Cadherin mRNA durch Hybridisierung mit einer, der E-Cadherin mRNA komplementären Nukleinsäure-Sonde untersucht.
5. Verfahren nach Anspruch 4, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß man als Nukleinsäure-Sonde zum Nachweis der E-Cadherin mRNA die gesamte für E-Cadherin kodierende cDNA oder ein mindestens 14 Nukleotide langes Fragment davon verwendet.

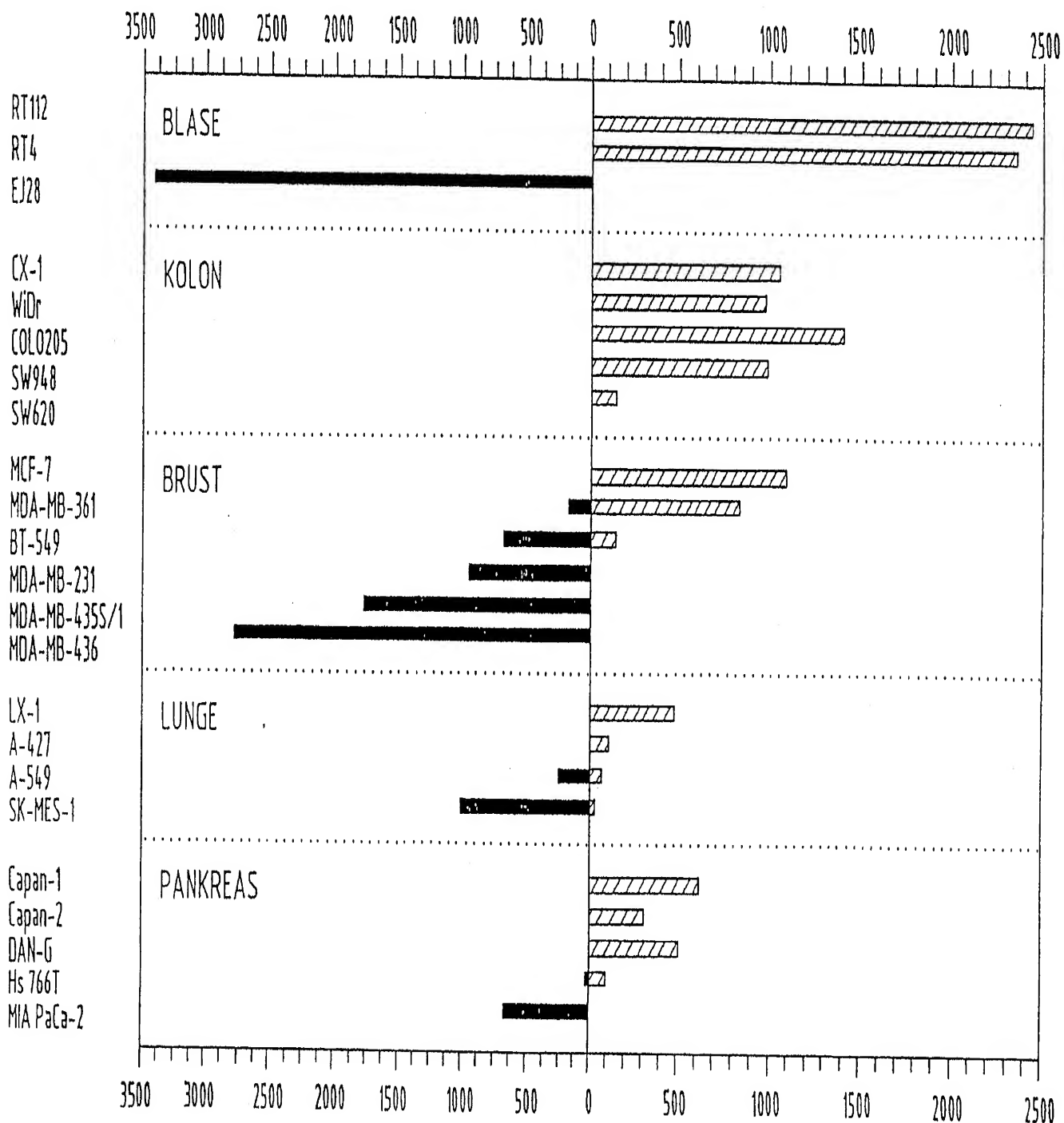
6. Verfahren nach Anspruch 5,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man eine Nukleinsäure-Sonde aus der in Fig. 1 darge-
stellten Nukleinsäuresequenz des Klons HC6-1 verwendet.
7. Nukleinsäure-Sonde, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t , daß sie die in Fig. 1
dargestellte Nukleinsäuresequenz des Klons HC6-1 oder
ein mindestens 14 Basen langes Fragment der E-Cadherin-
cDNA enthält.
8. Verwendung einer zu E-Cadherin mRNA komplementären
Nukleinsäure-Sonde zum Nachweis der Differenzierung
oder/und Invasivität von Tumorzellen epithelischen Ur-
sprungs.

Fig. 1

		10	20	30	40	50	60	
HC 6-1	1	GGAGGTCTTTAAGGGGTCTGTCATGGAAGGTGCTCTTCCAGGAACCTCTGTGATGGAGGT						60
MENSCH	279	GGAGGTCTTTAAGGGGTCTGTCATGGAAGGTGCTCTTCCAGGAACCTCTGTGATGGAGGT						338
MAUS	865	GGAGGTGTTTGAGGGATCCGTTGCAGAAGGCGCTGTTCCAGGAACCTCCGTGATGAAGGT						924
		70	80	90	100	110	120	
HC 6-1	61	CACAGCCACAGACGCGGACGATGATGTGAACACCTACAATGCCGCCATCGCTTACACCAT						120
MENSCH	339	CACAGCCACAGACGCGGACGATGATGTGAACACCTACAATGCCGCCATCGCTTACACCAT						398
MAUS	925	CTCAGCCACCGATGCAGACGATGACGTCAACACCTACAACGCTGCCATCGCTTACACCAT						984
		130	140	150	160	170	180	
HC 6-1	121	CCTCAGCCAAGATCCTGAGCTCCCTGACAAAAATATGTTCAACCATTAACAGGAACACAGG						180
MENSCH	399	CCTCAGCCAAGATCCTGAGCTC						420
MAUS	985	CGTCAGCCAGGATCCTGAGCTGCCTCACAAAACATGTTCACTGTCAATAGGGACACCGG						1044
		190	200	210	220	230	240	
HC 6-1	181	AGTCATCAGTGTGGTCACCACTGGGCTGGACCGAGAGAGTTTCCCTACGTATAACCTGGT						240
MAUS	1045	GGTCATCAGTGTGCTCACCTCTGGGCTGGACCGAGAGAGTTACCTACATACACTCTGGT						1104
		250	260	270	280	290	300	
HC 6-1	241	GGTTCAAGCTGCTGACCTTCAAGGTGAGGGGTTAAGCACAACAGCAACAGCTGTGATCAC						300
MAUS	1105	GGTTCAAGCTGCTGACCTTCAAGGCGAAGGCTTGAGCACAACAGCAAGGCTGTGATCAC						1164
		310	320	330	340	350	360	
HC 6-1	301	AGTCACTGACACCAACGATAATCCTCCGATCTTCAATCCCACACGTACAAGGGTCAGGT						360
MAUS	1165	TGTCAAGGATATTAATGACAACGCTCCTGTCTTCAACCCGAGCACGTATCAGGGTCAAGT						1224
		370	380					
HC 6-1	361	GCCTGAGAACGAGGCTAACGTCGTAA						386
MAUS	1225	GCCTGAGAATGAGGTCAATGCCCGGA ...						1251

Fig. 2

 INVASIVITÄT
 [Zellen/cm²]

 E-CADHERIN
 [ipm/30000 Zellen]


INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 92/00692

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.⁵ C12Q 1/68; G01N 33/574; C07K 15/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl.⁵ C12Q; G01N; C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOURNAL OF CANCER RESEARCH AND CLINICAL ONCOLOGY vol. 116/S, 1990, BERLIN, GERMANY page 182; J. PFISTERER ET AL.: 'ARC-1/uvomorulin by immunohistochemistry in non malignant tissues and in ovarian tumors'	1,2
Y	see the whole document	4,5,8
X	DIFFERENTIATION, vol. 38, No. 1, June 1988, BERLIN, GERMANY pages 67 - 71; A. MANSOURI ET AL.: 'Characterization and chromosomal localization of the gene encoding the human cell adhesion molecule uvomorulin' (cited in the application)	7
Y	see abstract, see page 67, right-hand column, line 23 - line 26; figure 2	4,5,8
	--- ./.	

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1st June 1992 (01.06.92)

Date of mailing of the international search report

10 June 1992 (10.06.92)

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 92/000692

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol. 108, No. 6, June 1989, NEW YORK, USA pages 2435 - 2447; J. BEHRENS ET AL.: 'Dissecting tumor cell invasion: Epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvormorulin-mediated cell-cell adhesion' (cited in the application), see abstract see page 2439, right-hand column, line 8 - page 2444, right-hand column, line 12	1
P,X	JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol. 113, No. 1, April 1991, NEW YORK, USA pages 173-185; U.H. FRIXEN ET AL.: 'E-cadherin -mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells' see the whole document	1-8

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 92/00692

I. KLASSEFIZIKATION DES ANMELDUNGS-GE-GENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC. Int.Kl. 5 C12Q1/68; G01N33/574; C07K15/00		
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff ⁷		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int.Kl. 5	C12Q ; G01N ; C07K	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸		
III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN ⁹		
Art. ^o	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
X	JOURNAL OF CANCER RESEARCH AND CLINICAL ONCOLOGY Bd. 116/S, 1990, BERLIN, GERMANY Seite 182; J. PFISTERER ET AL.: 'ARC-1/uvomorulin by immunohistochemistry in non-malignant tissues and in ovarian tumors'	1,2
Y	siehe das ganze Dokument ---	4,5,8
X	DIFFERENTIATION Bd. 38, Nr. 1, Juni 1988, BERLIN, GERMANY Seiten 67 - 71; A. MANSOURI ET AL.: 'Characterization and chromosomal localization of the gene encoding the human cell adhesion molecule uvomorulin'	7
Y	in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung siehe Seite 67, rechte Spalte, Zeile 23 - Zeile 26; Abbildung 2 ---	4,5,8
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>^o Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen ¹⁰ :</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p style="text-align: center;">-/-</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>		
IV. BESCHEINIGUNG		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
01. JUNI 1992		10. 06. 92
Internationale Recherchenbehörde		Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten
EUROPAISCHES PATENTAMT		LUZZATTO E.R.

III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>JOURNAL OF CELL BIOLOGY Bd. 108, Nr. 6, Juni 1989, NEW YORK, USA Seiten 2435 - 2447; J.BEHRENS ET AL.: 'Dissecting tumor cell invasion: Epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion' in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung siehe Seite 2439, rechte Spalte, Zeile 8 - Seite 2444, rechte Spalte, Zeile 12</p> <p>---</p>	1
P,X	<p>JOURNAL OF CELL BIOLOGY Bd. 113, Nr. 1, April 1991, NEW YORK, USA Seiten 173 - 185; U.H.FRIXEN ET AL.: 'E-cadherin -mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells' siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-8